

07.10.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年10月20日

出願番号  
Application Number: 特願2003-358980  
[ST. 10/C]: [JP2003-358980]

出願人  
Applicant(s): 旭化成株式会社

REC'D 29 OCT 2004

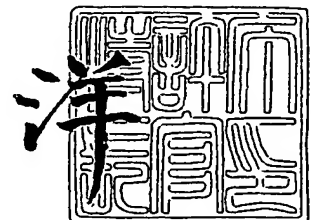
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
【整理番号】 X1031114  
【提出日】 平成15年10月20日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12M 3/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区夜光1丁目3番1号 旭化成株式会社内  
    【氏名】 仲野 靖浩  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区夜光1丁目3番1号 旭化成株式会社内  
    【氏名】 石原 尚子  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000000033  
    【氏名又は名称】 旭化成株式会社  
    【代表者】 蛭田 史郎  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 011187  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

細胞培養液中で、互いに異なる細胞群を相互に接触可能な状態で仕切って、細胞を共培養するために用いられる細胞培養用隔膜であって、有機高分子化合物からなる少なくとも一枚の多孔膜と、これに隣接する少なくとも一枚の支持多孔膜によって構成され、多孔膜に隣接する支持多孔膜面の少なくとも一部において、多孔膜を構成する有機高分子化合物が支持多孔膜中に侵入しており、多孔膜の膜平面を顕微鏡写真により観察した場合の、多孔膜の開孔率は10～90%、平均孔直径 $D$  ( $\mu\text{m}$ ) は $0.1 \leq D \leq 50$ 、孔直径の標準偏差 $\sigma$  ( $\mu\text{m}$ ) は $0 \leq \sigma/D \leq 0.6$ であって、かつ、多孔膜が有する貫通孔の割合が30%以上であり、支持多孔膜が $0.5D$  ( $\mu\text{m}$ ) 以上の平均気孔径の連通孔を有することを特徴とする細胞培養用隔膜。

**【請求項 2】**

細胞培養液中に請求項1記載の細胞培養用隔膜を配置して、少なくとも2つの培養領域を設け、少なくとも2つの隣接する培養領域に、互いに異なる細胞群をそれぞれ導入して細胞を共培養することを特徴とする細胞培養方法。

**【請求項 3】**

支持多孔膜上に、有機高分子化合物の疎水性有機溶媒溶液をキャストした後、膜近傍の相対湿度が20～100%の環境下で疎水性有機溶媒を蒸発させ、該有機高分子化合物を主成分としてなる多孔膜を支持多孔膜上に成膜することを特徴とする請求項1記載の細胞培養用隔膜の製造方法。

**【請求項 4】**

有機高分子化合物の疎水性有機溶媒溶液と相溶しない液体を、予め支持多孔膜に保持させた状態にて、多孔膜を支持多孔膜上に成膜することを特徴とする請求項3記載の細胞培養用隔膜の製造方法。

**【請求項 5】**

有機高分子化合物の疎水性有機溶媒溶液と相溶しない液体が水であることを特徴とする請求項4記載の細胞培養用隔膜の製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】細胞培養用隔膜

【技術分野】

【0001】

本発明は、培養液中にて2種類以上の異種細胞群を共培養する際に、異種細胞群が互いに混じり合うことなく分離された状態を維持しながら、しかも異種細胞間の効果的な接触を可能とする細胞培養用隔膜、前記隔膜を用いた細胞培養方法および前記隔膜の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

医療領域およびバイオプロセス領域では、各種の有用な細胞を効果的に増殖させる細胞培養を目指し、培養液組成の探索、効果的な細胞増殖用足場の設計等に関する様々な技術開発がなされている。

特に近年では、各種臓器に分化する潜在能力を有する幹細胞を扱う再生医療が注目され、血管、心筋、脾臓等のいくつかの種類の臓器再生技術が臨床応用の段階に入っている。このような再生医療をさらに発展させるためには、種々の基礎および臨床実験を行うための大量の幹細胞が必要であるため、現在では幹細胞ソースからの幹細胞採取技術の開発に加え、採取した幹細胞を未分化のまま効果的に体外増殖するための培養技術の開発が注目されている。

【0003】

例えば、造血幹細胞を移植する再生医療は、従来からの骨髄移植に代表される急性骨髄性白血病治療や再生不良性貧血治療だけでなく、最近では最重症の末梢動脈閉塞性疾患（バージャー病、閉塞性動脈硬化症、糖尿病性壊疽等）に対しての血管新生治療としての有効性が注目され、造血幹細胞移植による血管新生療法は医学会において認知された治療法になりつつある。したがって、上記疾患を含めた各種疾患への造血幹細胞移植治療を今後さらに幅広く展開して行くためには、研究および臨床応用のための十分な量の造血幹細胞を確保するための技術開発が必要である。

造血幹細胞を採取するためのソースとしては、現在では骨髄、末梢血および臍帯血が代表的であるが、造血幹細胞の採取時のドナーに対する非侵襲性およびドナーの拘束時間短縮の観点から、最近では臍帯血由来の造血幹細胞移植例が急激に伸びている（例えば、2003年4月には臍帯血移植の月間件数（47件）が、骨髄移植件数の46件をはじめて上回った）。

【0004】

しかし、臍帯血をソースとする造血幹細胞採取の欠点は、一人のドナーからの採取量が少ないことであり、臍帯血由来の造血幹細胞移植は、身体の小さい小児患者への適用が主体となっているのが現状である。したがって、一人のドナーの臍帯血から採取された造血幹細胞を、体外にて未分化のまま効果的に増殖することができれば、成人患者への移植も無理なく行えるようになるため、非常に画期的な技術になると言える。

すなわち、造血幹細胞移植治療には、一人のドナーに由来する造血幹細胞をより多く採取して移植することが重要であるため、臍帯血由来の造血幹細胞だけでなく、末梢血および骨髄由来のものも含め、造血幹細胞を効果的に増殖しようとする研究が盛んに行われている。

【0005】

最近、ある種のサイトカインの存在下、臍帯血由来の造血幹細胞をマウス骨髄由来ストローマ細胞と共培養すると、未分化なCD34陽性細胞の増殖が顕著に促進されたことが非特許文献1に報告されている。この場合、造血幹細胞とマウス骨髄由来ストローマ細胞は、ある種の高分子隔膜材料で分離された状態で共培養されているが、造血幹細胞は高分子隔膜材料の孔を介し、ストローマ細胞から伸びた絨毛と接触することによって未分化のまま効果的に増殖されると述べられている。このように隔膜材料で分離した状態で造血幹細胞を異種細胞と共培養し、隔膜の孔を介した細胞間接触によって造血幹細胞を増殖する

ような培養技術が発展すれば、増殖後の造血幹細胞の分離採取も容易となるので、非常に実用的な造血幹細胞の体外増殖法となる可能性がある。

#### 【0006】

上記のように、ある種の有用細胞を異種細胞との共培養によって増殖し、しかも増殖後に有用細胞を容易に、かつ、効率良く回収するためには、多数の孔を有する隔膜材料の使用が有効である。このような用途に使用される隔膜材料に要求される性能としては、(1) 細胞自体の隔膜間移動が起こらない範囲においてできるだけ大きな孔を有することにより、細胞間接触のみを効果的に行えること、(2) 効果的な細胞間接触を行うため隔膜の開孔率が高いこと、(3) 同じく効果的な細胞間接触を行うため隔膜の膜厚が小さいこと、(4) 増殖後の有用細胞回収作業等を容易にする高い膜強度を有すること、(5) 効果的な細胞培養に適した種々の膜形態に加工できること、等が挙げられる。

#### 【0007】

まず、上記の条件(1)を満たすためには、孔径均一性が高い膜材料を選択し、そのような孔径が均一な膜材料から細胞自体の隔膜間移動が起こらない範囲において、できるだけ大きな平均孔径を有するものを隔膜として用いることが好ましい。

そのような孔径均一性の高い膜材料としては、例えば、高分子繊維系メッシュが考えられるが、一般にその孔径は一辺が20  $\mu\text{m}$  弱の正方形孔のものが最も小さいレベルのものであるため、細胞培養用隔膜として用いる場合、一般的な細胞では孔を介した細胞移動が起こる。特に、直径が7  $\mu\text{m}$  前後であるとされる造血幹細胞の培養用隔膜には使用することはできない。また金属メッシュや特殊製法による高分子繊維系メッシュには孔径が10  $\mu\text{m}$  未満のものも存在するが、このような材料では、開孔率が著しく低下しているのが普通であるので、上記の条件(2)を満足できず、隔膜として使用できても効果的な細胞間接触を行うことができず、細胞共培養用隔膜としては実用的とは言えない。

#### 【0008】

メッシュではない、孔径均一性の高い膜材料としては、ポリカーボネート等の薄膜にイオンビームを照射後、エッチング工程を経て製造される「エッチング膜」が広く知られている。このエッチング膜は、均一な円筒状の孔群を有し、孔サイズの均一性が非常に高く、しかも数ミクロンからサブミクロンのサイズにおいて種々の孔径のものが成膜できるため、非特許文献1においても隔膜として使用されている。しかし、このエッチング膜も製造プロセス上、4%前後の開孔率しか得られないため(開孔率を上げようとすれば孔径均一性が失われる)、メッシュと同様に上記の条件(2)を満足できず、やはり実用的な細胞共培養用隔膜にはなり得ない。

#### 【0009】

非特許文献2および3には、有機高分子化合物の疎水性有機溶媒溶液を平滑な固体基板(例えば、ガラス、シリコンウエハー、金属板、高分子固体ゲル等)または液体上(例えば、水)にキャストして、相対湿度が40~95%の高湿度エアーを吹き付けると、有機溶媒溶液からの溶媒揮発過程において潜熱が奪われることにより、溶液上に微小水滴が凝縮生成し、最終的にこの微小水滴が鋳型となって数 $\mu\text{m}$ オーダーの孔径、高い孔径均一性、および30%前後の高い開孔率を有する特殊な多孔性薄膜が種々の高分子素材を用いて作成できることが示されている。

このような構造を有する膜材料は、上記の条件(1)~(3)を満たすため効果的な細胞培養用の隔膜材料として使用できる可能性があるが、この多孔性薄膜の膜厚は数ミクロンであるため、強度が非常に低く、膜の破損が容易に起こる。したがって、大量の細胞の培養を目指して大きな膜面積で使用したり、また大量の細胞増殖や、目的細胞の分離採取に適した種々の形状(袋状やロール状等)に加工して使用するといったことも困難であるため、上記の条件(4)および(5)を満たせず、このままでは実用的な細胞培養用隔膜にはなり得ない。

#### 【0010】

【非特許文献1】最新医学、58巻、1号(2003)、63ページ。

【非特許文献2】Polymer Preprints, Japan Vol. 50

, No. 12 (2001), 2804 ページ.

【非特許文献3】 Polymer Preprints, Japan Vol. 51  
, No. 5 (2002), 961 ページ.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、細胞培養液中にて、2種以上の異種細胞群を共培養する際、異種細胞群が互いに混じり合うことなく分離された状態を維持しながら、しかも分離された異種細胞同士の細胞間接触を効果的に可能とする細胞培養用隔膜であって、しかも効果的な培養に適する膜形態、または増殖後の目的細胞の分離を容易とする種々の膜形態への加工を可能とする十分な膜強度を有する細胞培養用隔膜を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、上記の目的を達成するために鋭意検討を行った結果、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 細胞培養液中で、互いに異なる細胞群を相互に接触可能な状態で仕切って、細胞を共培養するために用いられる細胞培養用隔膜であって、有機高分子化合物からなる少なくとも一枚の多孔膜と、これに隣接する少なくとも一枚の支持多孔膜によって構成され、多孔膜に隣接する支持多孔膜面の少なくとも一部において、多孔膜を構成する有機高分子化合物が支持多孔膜中に侵入しており、多孔膜の膜平面を顕微鏡写真により観察した場合の、多孔膜の開孔率は10～90%、平均孔直径 $D$  ( $\mu\text{m}$ ) は  $0.1 \leq D \leq 50$ 、孔直径の標準偏差 $\sigma$  ( $\mu\text{m}$ ) は  $0 \leq \sigma/D \leq 0.6$  であって、かつ、多孔膜が有する貫通孔の割合が30%以上であり、支持多孔膜が  $0.5D$  ( $\mu\text{m}$ ) 以上の平均気孔径の連通孔を有することを特徴とする細胞培養用隔膜。

(2) 細胞培養液中に(1)に記載の細胞培養用隔膜を配置して、少なくとも2つの培養領域を設け、少なくとも2つの隣接する培養領域に、互いに異なる細胞群をそれぞれ導入して細胞を共培養することを特徴とする細胞培養方法。

(3) 支持多孔膜上に、有機高分子化合物の疎水性有機溶媒溶液をキャストした後、膜近傍の相対湿度が20～100%の環境下で疎水性有機溶媒を蒸発させ、該有機高分子化合物を主成分としてなる多孔膜を支持多孔膜上に成膜することを特徴とする(1)に記載の細胞培養用隔膜の製造方法。

(4) 有機高分子化合物の疎水性有機溶媒溶液と相溶しない液体を、予め支持多孔膜に保持させた状態にて、多孔膜を支持多孔膜上に成膜することを特徴とする(3)に記載の細胞培養用隔膜の製造方法。

(5) 有機高分子化合物の疎水性有機溶媒溶液と相溶しない液体が水であることを特徴とする(4)に記載の細胞培養用隔膜の製造方法。

【発明の効果】

【0013】

本発明の細胞培養用隔膜は、ミクロンサイズの孔径、高い孔径均一性および高い開孔率を有するため、細胞培養液中の異種細胞群が互いに混じり合うことなく分離された状態を維持しながらも、分離された異種細胞同士の効果的な細胞間接触を可能とする。したがって、異種細胞との接触による目的細胞の効果的な増殖(例えば、分化を抑制した状態での増殖)が可能である。しかも、支持多孔膜によって十分な力学的強度も付与されているため、実用的な細胞増殖に適した大面積での使用や種々の膜形態へ加工が容易となり、その結果、多量の目的とする細胞の増殖と、その増殖後の分離操作が容易である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明の細胞培養用隔膜は、細胞培養液中で、互いに異なる細胞群を相互に接触可能な状態で仕切って、細胞を共培養するために用いられるものであって、有機高分子化合物か

らなる少なくとも一枚の多孔膜と、これに隣接する少なくとも一枚の支持多孔膜とから構成される。

本発明において、「細胞の共培養」、とは、単に2種類以上の細胞群を培養液中で同時に増殖させるだけでなく、互いに異なる細胞群が相互に接触することによって、少なくとも1種類の細胞の増殖および／または分化を促進する場合、少なくとも1種類の細胞の分化を抑制しつつ増殖させる場合等も含むものとする。

#### 【0015】

まず、有機高分子化合物からなる多孔膜について説明する。

多孔膜が有する孔の形状は、特に外力（例えば、細胞培養用隔膜自体を一軸方向に引っ張る）を加えない限り円形である。円形とは、完全な真円の他に、孔形状は疎水性有機溶媒溶液の組成や製造条件（例えば、ガスの吹き付けの強さ等）によって若干変形して楕円状になるが、これも上記の円形に含まれる。

多孔膜の膜平面を顕微鏡写真により観察した場合の、多孔膜の開孔率は10～90%、平均孔直径 $D$  ( $\mu\text{m}$ ) は $0.1 \leq D \leq 50$ 、孔直径の標準偏差 $\sigma$  ( $\mu\text{m}$ ) は $0 \leq \sigma/D \leq 0.6$ である。

#### 【0016】

多孔膜の開孔率は10～90%であり、好ましくは15～80%、より好ましくは20～80%、最も好ましくは25～80%である。開孔率が10%未満であると、多孔膜の孔を介した異種細胞間の接触が充分に行われない。開孔率が90%を越えると、多孔膜の強度が著しく低下するため、多孔膜の破損等の原因となる。

平均孔直径 $D$  ( $\mu\text{m}$ ) は $0.1 \leq D \leq 50$ 、好ましくは $0.2 \leq D \leq 30$ 、より好ましくは $0.4 \leq D \leq 20$ 、最も好ましくは $0.5 \leq D \leq 10$ である。 $D$ が $50 \mu\text{m}$ を越えると、多孔膜の孔を介した細胞移動が容易に起こり、増殖後に目的細胞群（例えば、造血幹細胞）を単離（分離）することが困難となる。 $D$ が $0.1 \mu\text{m}$ 未満の場合、孔が小さすぎるため、多孔膜を隔てた異種細胞間接触による目的細胞の充分な増殖が行われない。

#### 【0017】

孔直径の標準偏差 $\sigma$  ( $\mu\text{m}$ ) は $0 \leq \sigma/D \leq 0.6$ であり、好ましくは $0 \leq \sigma/D \leq 0.5$ 、より好ましくは $0 \leq \sigma/D \leq 0.4$ 、最も好ましくは $0 \leq \sigma/D \leq 0.3$ である。 $\sigma/D$ が $0.6$ を越えると、多孔膜の孔を介した細胞移動が起こり易くなり、それを防ぐためには培養する細胞サイズよりもかなり小さい $D$ 値の多孔膜からなる細胞培養用隔膜を用いなければならないが、その場合には異種細胞間の接触効率が低下する。

本発明の細胞培養用隔膜は、多孔膜に隣接する支持多孔膜面の少なくとも一部において、多孔膜を構成する有機高分子化合物が支持多孔膜中に侵入していることを特徴とする。例えば、支持多孔膜が不織布の場合、多孔膜の表面を電子顕微鏡で観察すると、多孔膜が不織布の一部の面（繊維部分や繊維交絡部分）に侵入した結果、孔形状が乱れたり、孔が多孔膜の裏面（支持多孔膜側）において閉塞している状態（非貫通構造）を観察することができる。

#### 【0018】

本発明の細胞培養用隔膜において、多孔膜が有する全孔に占める貫通孔の割合は30%以上であり、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、最も好ましくは60%以上である。貫通孔の割合が30%未満であると、多孔膜の孔を介した異種細胞間の接触効率が低下する。

#### 【0019】

本発明において、「貫通孔」、とは、多孔膜のある任意の孔 $P$ に注目した場合、多孔膜の膜平面の電子顕微鏡写真から実測される孔 $P$ の面積（例えば、孔形が円形であればその孔直径 $d$ から計算される $(d/2)^2 \pi$ の値）を $S(P)$ とすると、その孔 $P$ を通して反対側の支持多孔膜の構造が観察できる領域（いわゆる貫通領域）の面積が $S(P)$ の70%以上あるものをいう。

本発明において、「貫通孔の割合」、とは、多孔膜の膜平面の電子顕微鏡写真から観察される孔のうちの貫通孔の割合をいう。例えば、「孔の貫通率が50%」、とは、10個

の孔があれば、その中の5個が「貫通孔」であることを意味する。

#### 【0020】

多孔膜の膜厚は、好ましくは0.1～50  $\mu\text{m}$ である。膜厚が小さすぎると膜強度が小さくなり、細胞培養中または目的細胞の分離操作中に、膜の破損の原因となり易い。また、50  $\mu\text{m}$ を越えると多孔膜の孔を介した細胞間接触が困難となり、また膜厚は平均孔直径Dと相関するため、膜厚が大きすぎると孔径も必然的に大きくなり、孔を介した細胞移動が起こり易くなる。

多孔膜を形成する有機高分子化合物は制限されないが、例えば、ポリ乳酸、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリエチレンアジペート、ポリブチレンアジペート等のポリエステル類、ポリウレタン類、ポリ(メタ)アクリル酸エステル類、ポリビニルアセタール類、ポリアミド類、ポリスチレン類、ポリスルホン類、セルロース誘導体類、ポリフェニレンエーテル類、ポリカーボネート類等の単独素材、これらから選ばれる2種以上のポリマーのアロイやブレンド物、または上記ポリマーを形成するモノマーの共重合体等が挙げられるが、有機高分子化合物は上記の例に限定されるものではない。

#### 【0021】

次に、支持多孔膜について説明する。

支持多孔膜は、細胞培養用隔膜を構成する多孔膜を支持・補強して複合多孔膜に十分な力学的強度を付与する機能と、場合によっては培養細胞の足場としての機能を有し、しかも多孔膜を介した細胞間接触を可能とするため、細胞が支持多孔膜内を移動できる孔サイズを有することが好ましい。したがって支持多孔膜の平均気孔径は、多孔膜の平均孔直径をD( $\mu\text{m}$ )とすると、0.5D( $\mu\text{m}$ )以上が好ましく、0.8D( $\mu\text{m}$ )以上がより好ましく、1D( $\mu\text{m}$ )以上が最も好ましい。平均気孔径が0.5D未満であると、細胞自体または細胞からの絨毛の通過を阻害し、多孔膜を介した細胞間接触が困難になる。「平均気孔径」は、パームポロメーター(Porous Materials, Inc. 製)を用い、ASTM-F316-86に記載されているバブルポイント法に準じて測定される値である。

#### 【0022】

連通孔とは、支持多孔膜の一方の膜面から反対側の膜面にかけて連通した孔のことであって、その連通孔を通して液体やガスが通過することができるのであれば、その孔の膜表面膜内部の構造はどのようなものであってもよい。

細胞培養用隔膜を構成する支持多孔膜の膜厚は、大きすぎると種々の形態への加工性が低下し、細胞自体の通過性(移動性)を阻害する場合があるので、膜厚は10mm以下が好ましく、5mm以下がより好ましく、3mm以下が最も好ましい。支持多孔膜が薄すぎると、支持層としての役割を果たせなくなる傾向があるため、好ましくは1  $\mu\text{m}$ 以上、より好ましくは5  $\mu\text{m}$ 以上、最も好ましくは10  $\mu\text{m}$ 以上である。

#### 【0023】

支持多孔膜の具体例としては、天然繊維、合成高分子繊維、再生高分子繊維、ガラスや金属繊維に代表される無機繊維、有機/無機複合繊維等より得られる不織布、織布、編布等やメッシュ類が挙げられる。また、例えば、有機高分子素材を、熱溶融した状態、溶媒によって溶解した溶液状態、可塑剤を用いて可塑化した状態等から、発泡法、相分離法(熱誘起相分離法や湿式相分離法)、延伸法、焼結法等によって得られる三次元網状連続孔を有する多孔質体(多孔質膜)も挙げられる。

支持多孔膜に用いられる素材としては有機高分子素材が好ましく、例えば、ポリアルキレンテレフタレート類、ポリカーボネート類、ポリウレタン類、ポリ(メタ)アクリル酸エステル類、ポリアクリロニトリル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、ポリエステル類、ポリアミド類、ポリスチレン、ポリスルホン類、セルロースおよびセルロース誘導体類、ポリフェニレンエーテル類、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリフッ化ビニル、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン等、これらを構成するモノマーの共重合体、さらには上記高分子の1種または2種以上のアロイ、ブレンド等が用いられるが、上記の例に限定されるものではない。

## 【0024】

支持多孔膜として好ましいものとして、有機高分子繊維より得られる不織布、織布、編布、メッシュ類が挙げられ、それらを構成する有機高分子素材としては、例えば、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、セルロース誘導体、ポリアミド、ポリアクリロニトリル等が挙げられ、そのうち、ポリエチレンテレフタレートは特に好ましい。

本発明の細胞培養用隔膜は、多孔膜と支持多孔膜が複合化されているものであり、多孔膜に隣接する支持多孔膜面の少なくとも一部において、多孔膜を構成する有機高分子化合物が支持多孔膜中に侵入することによって、両者が接着した構造が存在する。この構造の存在は、多孔膜の電子顕微鏡観察によって確認することができ、この構造の存在によって多孔膜と支持多孔膜の高い接着性が発現する。

## 【0025】

細胞培養用隔膜は、多孔膜と支持多孔膜が隣接、かつ、接着（多孔膜が支持多孔膜に侵入した構造）した構造を有していればよく、例えば、多孔膜1枚と支持多孔膜1枚が複合化された2層構造（すなわち、「多孔膜／支持多孔膜」の構造）、支持多孔膜の両面が多孔膜である3層サンドイッチ構造（「多孔膜／支持多孔膜／多孔膜」の構造）、多孔膜の両面が支持多孔膜である3層サンドイッチ構造（「支持多孔膜／多孔膜／支持多孔膜」の構造）、支持多孔膜の片面に2層の多孔膜が存在する3層構造（「多孔膜／多孔膜／支持多孔膜」構造）、等の構造が挙げられる。多孔膜1枚と支持多孔膜1枚が複合化された2層構造（すなわち、「多孔膜／支持多孔膜」の構造）は製造が簡単であり、培養後の培養液からの目的細胞の単離（分離）も容易とすることができるので好ましい。

## 【0026】

支持多孔膜または多孔膜がそれぞれ複数存在する場合は、それぞれの支持多孔膜、または多孔膜の孔径、平均気孔径、膜を構成する素材等は同一であっても、異なってもよい。

本発明の細胞培養用隔膜の膜厚は、厚すぎると種々の形態への加工特性が低下するので、その膜厚は10mm以下が好ましく、5mm以下がより好ましく、3mm以下が最も好ましい。一方、薄すぎると取り扱い性および加工性が低下するので、その膜厚は1μm以上が好ましく、5μm以上がより好ましく、10μm以上が最も好ましい。

## 【0027】

本発明の細胞培養用隔膜を用いて細胞培養を行うには、本発明の細胞培養用隔膜を細胞培養液中に配置する。隔膜の枚数および形態に依存して、本発明の隔膜によって隔てられた培養領域が少なくとも2つ得られる。その少なくとも2つの隣接する培養領域において、互いに異なる種類の細胞群を共培養する。例えば、同じ大きさの四角形に切断した2枚の細胞培養用隔膜を、内側を支持多孔膜（例えば、不織布）にして重ね合わせて3辺をヒートシールして得られる袋状の隔膜シートを細胞培養液中に1枚配置すれば（袋の開口部は液面より上に出すか、封じておく）、袋状隔膜シートの内部と外部（袋の内部と外部）に多孔膜にて隔てられた2つの隣接する培養領域が得られるので、内部と外部の2つの培養領域にて細胞を共培養することができる。同様に2枚の袋状隔膜シートを培養液中に配置すれば、多孔膜にて隔てられた培養領域が3つ得られ、3枚装入すれば4つの培養領域が得られる。

## 【0028】

すなわち、多孔膜に隔てられた少なくとも2つの隣接する培養領域において異種細胞群を共培養し、しかも支持多孔膜の平均気孔系と多孔膜の平均孔径を培養する細胞サイズに合わせて調整することによって、効果的な細胞間接触を可能とする細胞共培養を行うことができる。

本発明の細胞培養用隔膜は、所望の形態に加工できるので、増殖後の目的とする細胞の分離・回収が非常に容易である。例えば、既述の袋状隔膜シートを用いる共培養では、目的細胞が袋状シートの外部で増殖された場合、培養液から袋状隔膜シートを取り出すだけで目的細胞を容易に分離・回収できる（当然、必要に応じてピペティングや遠心分離操作が必要となる）。

## 【0029】

本発明の細胞培養方法によると、細胞培養液中において、少なくとも2種類の細胞群が相互に接触可能な状態で仕切られて共培養される。共培養される細胞群の組み合わせは限定されないが、互いに異なる細胞同士が接触することによって、少なくとも1種の細胞の増殖や分化に影響を与える細胞群の組み合わせが好ましい。特に、互いに接触することによって、少なくとも1種の細胞の増殖および／または分化を促進したり、分化を抑制しつつ増殖のみを促進するような細胞群の組み合わせが好ましい。

そのような細胞群の組み合わせとして、例えば、細胞間接触によって造血幹細胞が、未分化の状態での増殖のみが優先的に促進されると言われる「造血幹細胞群とマウス骨髄由来ストローマ細胞群」の組み合わせ、「造血幹細胞群とヒト血管内皮細胞群」の組み合わせ等が挙げられる。なお、細胞間接触によって増殖させる目的細胞群としては、種々の再生医療への応用が検討されていること、さらに培養血液ビジネスへの展開の可能性も有することから、造血幹細胞群が好ましい例として挙げられる。

## 【0030】

次に、本発明の細胞培養用隔膜の製造方法について説明する。

多孔膜と支持多孔膜の複合法として、1) 多孔膜と支持多孔膜を別途準備し、それぞれを接着する方法、2) 支持多孔膜上に多孔膜を形成して、接着と膜形成を同時に行う方法等がある。2)の方法は、多孔膜の孔構造を破壊することなく、また多孔膜の孔径均一性や支持多孔膜の強度を低下させることなく、簡便に複合化された膜を製造することが可能である。

本発明の細胞培養用隔膜の製造方法は、(a) 支持多孔膜上に、有機高分子化合物の疎水性有機溶媒溶液をキャストした後、(b) 膜近傍の相対湿度が20～100%の環境下で疎水性有機溶媒を蒸発させ、有機高分子化合物を主成分としてなる多孔膜を支持多孔膜上に成膜するという2つのステップからなる。

## 【0031】

本発明に用いられる「有機高分子化合物の疎水性有機溶媒溶液」とは、支持多孔膜上に成膜する多孔膜の主成分となる有機高分子化合物を、疎水性有機溶媒に溶解させた溶液である。その濃度は0.005～30wt%が好ましく、0.01～15wt%がより好ましく、0.02～5wt%が最も好ましい。濃度が0.005wt%未満であると、多孔膜の孔規則性(孔径均一性)が低下する場合があります、また膜強度が不十分となる場合がある。一方、濃度が30wt%を越えると、孔径均一性の高い孔構造を形成しにくくなる場合がある。

疎水性有機溶媒とは、水と任意の割合で相溶しない(均一化しない)有機溶媒であって、多孔膜を形成する有機高分子化合物を溶解する溶媒であれば限定されない。ただし、相対湿度20～100%において溶媒を蒸発させるため、蒸発除去が比較的容易にできる、揮発性が高い疎水性溶媒が好ましい。

## 【0032】

このような溶媒として、例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、ジクロロエタン等の塩化物またはフッ化物等のハロゲン系有機溶媒、ベンゼン、トルエン、キシレン、*n*-ヘキサン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、デカリン等の炭化水素系溶媒、酢酸エチル、酢酸ブチル等のエステル系溶媒、メチルイソブチルケトン等の非水溶性ケトン系溶媒等の1種または2種以上の混合物が挙げられる。中でもクロロホルムおよびトルエンが好ましく、特にクロロホルムは溶解できる有機高分子化合物の種類が多く、蒸発除去もさせやすいのでより好ましい。但し、クロロホルムは比重が約1.5であり、孔の鑄型となる微小水滴(比重1)の比重よりもかなり大きいため、多孔膜の孔が貫通しにくいことがある。その場合には、溶媒蒸発の過程において溶液比重を調整できる異種溶媒、例えば、トルエン等を予めクロロホルムに1～20wt%加えておくことと貫通孔の割合を高めることに対して効果的である。

## 【0033】

本発明によると、まず(a) 有機高分子化合物の疎水性有機溶媒溶液を、支持多孔膜上

にキャストする。キャストする方法は、支持多孔膜上に均一に溶液が展開される方法であればよく、限定されない。溶液の粘度が低い場合には、そのまま支持多孔膜上に流し込む。粘度が高い場合には、ブレードコーター等を用いて均一に展開する。

疎水性有機溶媒溶液を支持多孔膜にキャストする場合、疎水性有機溶媒溶液が支持多孔膜の孔内に入り込むことにより、孔を閉塞させないことが必要である。これを達成する方法としては、A) 支持多孔膜の素材として、疎水性有機溶媒溶液に濡れにくいものを用いる方法、B) 疎水性有機溶媒溶液の粘度を高くする方法、C) 疎水性有機溶媒溶液と相溶しない液体を予め支持多孔膜に保持させて、支持多孔膜が有する内部孔を該液体で満たしておく方法が挙げられる。

#### 【0034】

特に本発明において、支持多孔膜として好ましい粗大な連通孔を有する支持多孔膜（例えば、不織布、織布、編布、メッシュ等）を用いる場合は、支持多孔膜に疎水性有機溶媒溶液が容易に染み込み易くなるため、上記C)の方法を用いることが有効である。このC)の方法を用いると、疎水性有機溶媒溶液が支持多孔膜の内部に侵入することを防ぐので、該溶液を支持多孔膜上に薄く平滑にキャストすることができる。そのため、多孔膜を平滑に支持多孔膜上に形成することができ、最終的に有機高分子化合物が支持多孔膜を閉塞させることがない。

上記C)の方法において、「疎水性有機溶媒溶液と相溶しない液体」、とは、該溶液と任意の量にて混ぜ合わせても均質な溶液にならず、かつ、多孔膜の主成分となる有機高分子化合物をほとんど溶解しない液体のことをいう。相溶しない液体は、用いられる疎水性有機溶媒の種類に応じて選択されるので限定されるものではないが、多孔膜を成膜後、乾燥や洗浄によって容易に支持多孔膜内部から除去できるものが好ましい。

#### 【0035】

支持多孔膜に保持させる疎水性有機溶媒溶液と相溶しない液体が、鑄型となる水滴との親和性が高ければ多孔膜が貫通孔を形成しやすいので、例えば、水、塩化ナトリウム等の各種塩類を含む水溶液、ポリエチレングリコール等の水溶性液状ポリマー、またはそれらの水溶液等が相溶しない液体として好ましい。

工業的に取り扱うには単純な組成のものが好ましく、水がとりわけ好ましい。なお相溶しない液体は、多孔膜を形成する有機高分子化合物を溶解しないことが要求されるものの、疎水性有機溶媒溶液と該液体が成膜時に接したときに、疎水性有機溶媒溶液中の有機高分子化合物が該液体に実質上殆ど移動することがなければ、該液体は、有機高分子化合物をわずかに溶解するものであってもよい。

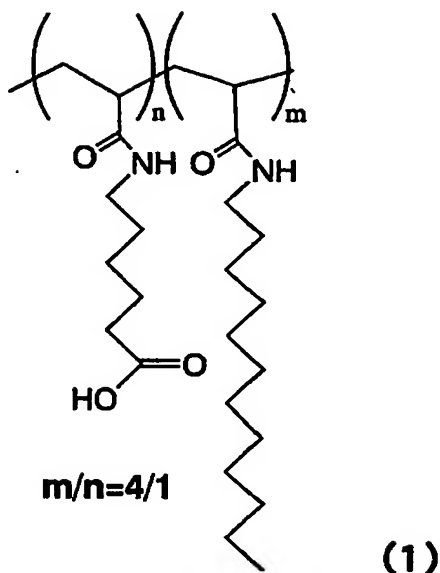
#### 【0036】

疎水性有機溶媒溶液と相溶しない液体を支持多孔膜に保持させる方法としては、支持多孔膜を予めこの液体に充分浸漬して、これを取り出して用いてもよく（この浸漬時に超音波照射を施せば支持多孔膜内部にさらに効果的に液体を保持させることができる）、疎水性有機溶媒溶液をキャストする前に支持多孔膜に直接該液体を垂らして染み込ませてもよく、該液体を噴霧状にて十分に吹き付けて保持させてもよい。

本発明に用いられる疎水性有機溶媒溶液に溶解する物質であれば、多孔膜の成膜安定性向上、強度向上、表面改質（例えば、親水性付与）、韌性付与等の目的で、その他の添加剤を疎水性有機溶媒溶液に加えてもよい。例えば、*Mater. Sci. Eng.*, C 89 巻, 495 ページ（1999年）に記載されたビスヘキサデシルアンモニウムブロミドをはじめとする両親媒性化合物の1種または2種以上を加えると、多孔膜の成膜安定性および孔サイズや孔形状均一性が高くなるので好ましい。特に化学式（1）で示されるポリアクリルアミド系両親媒性化合物は好ましい両親媒性化合物として挙げられる。

#### 【0037】

## 【化1】



## 【0038】

上記両親媒性化合物を疎水性有機溶媒溶液に加える場合、有機高分子化合物と両親媒性化合物の組成比（有機高分子化合物／両親媒性化合物（wt/wt））は限定されないが、好ましくは99/1～50/50（wt/wt）の範囲内である。99/1よりも両親媒性化合物が少ないと、孔径均一性の高い多孔膜が形成されにくくなり、50/50よりも両親媒性化合物が多いと、多孔膜の力学強度が低下し膜破れを起こしやすくなる。

次に、(b) 支持多孔膜上にキャストした疎水性有機溶媒溶液から、膜近傍の相対湿度が20～100%の環境下で疎水性有機溶媒を蒸発させ、その過程にてハニカム状の均一な孔構造を有する多孔膜を形成させる。

## 【0039】

疎水性有機溶媒を蒸発させる方法としては、液面近傍（成膜中の液面から垂直方向に約2cm離れた位置）の相対湿度が20～100%に設定されていればどのような方法を用いてもよく、例えば、成膜周辺環境の温度を上昇させる方法、成膜環境の気圧を適度に低下する方法、適当なガスを液面に緩やかに吹き付ける方法等が挙げられる。中でもガスを液面に吹き付ける方法は、多孔膜の鑄型となる微小な水滴の形成が容易であるし、湿度調整も容易であるし、装置も簡便となるので好ましい方法である。

ガスを液面に吹き付けて有機溶媒を蒸発させる場合、使用されるガスは、疎水性有機溶媒溶液に吹き付けることにより疎水性有機溶媒を効果的に蒸発させることができるのであれば、どのようなガスを用いてもよい。ただし、成膜の過程において、多孔膜、支持多孔膜および疎水性有機溶媒溶液に対して化学的に不活性であるものが好ましい。具体的なガスとしては、空気、窒素、酸素、ヘリウム、アルゴン等やそれらの混合ガスが挙げられ、コストパフォーマンスを考慮すれば、空気が好ましい。

## 【0040】

ガスを疎水性有機溶媒溶液に吹き付ける方法としては、供給ガス側にポンプを設置して適当なノズルからガスを供給して吹き付ける方法、逆に密閉タイプの恒温恒室ボックス等を用いる場合には、ボックス内を減圧して外部から該ガスを吸入し、適当なノズルを経由して疎水性有機溶媒溶液に吹き付ける方法等が用いられる。

ガスを吹き付ける等して、疎水性有機溶媒を蒸発させる際には、膜近傍の相対湿度が20～100%の環境下で行うが、30～90%が好ましく、35～80%が特に好ましい。相対湿度が30%未満の場合、孔を形成するための鑄型となる水滴の成長が不十分になるため、ハニカム状の均一な孔構造が形成されにくくなり、また孔の貫通性も悪くなる。

## 【0041】

「膜近傍の相対湿度が20～100%の環境」は、恒温恒湿ボックス内等の成膜環境全体の相対湿度を調整することにより設定してもよい。ガスを吹き付ける場合には、吹き付けるガスの相対湿度を調整することによって設定することができる。

疎水性有機溶媒が蒸発し、その過程で溶液表面に形成される微小水滴が鑄型となって支持多孔膜上に均一な孔構造を有する多孔膜が形成される。孔が形成された後、支持多孔膜に保持させた液体をそのまま乾燥除去するか、一旦アルコール等に浸漬して液体を置換したのち乾燥除去する。

本発明の製造方法において用いられる支持多孔膜は、親水性の向上（保水性の向上）等の製造プロセス上または使用上の種々の要請に応じて、様々な表面改質を施してもよい。

#### 【0042】

特に本発明において好ましく使用される製造方法、すなわち、支持多孔膜に水を保持させて多孔膜を成膜する場合、支持多孔膜の疎水性が強いと支持多孔膜内部に均一に水を保持させることができず、多孔膜を形成するためにキャストした疎水性有機溶媒溶液が支持多孔膜内部に染み込む。そのため、多孔膜を支持多孔膜上に平滑に成膜した形態の細胞培養用隔膜の製造が困難になる場合がある。この場合には、支持多孔膜表面に親水化処理を施し、保水性を上げることが好ましい。

上記のような製造上の理由に基づき、予め支持多孔膜に親水化処理を施す場合は、必要に応じて適当な親水性官能基を膜表面に導入すればよい。

#### 【0043】

親水性官能基を膜表面に導入する具体的な方法としては、膜基材表面にプラズマ処理やコロナ放電処理を施す方法、膜基材表面に元来存在する官能基に高分子反応によって親水性官能基等を導入する方法、膜基材の表面に電子線や $\gamma$ 線を照射してラジカルを発生させ、これに親水性官能基を有するモノマーを作用させてグラフト重合する方法、膜基材表面に必要な開始剤基を導入した後、必要に応じて触媒等を加えて行う種々のリビング重合法（例えば、リビングラジカル重合法やリビングアニオン重合法）にて親水性官能基を有するモノマーをグラフト重合する方法、膜基材表面に含浸法やスプレー法を用いて親水性官能基を有するポリマーをコーティングする方法等が挙げられる。特にコーティング法は、コーティング用ポリマーの合成反応時において、導入したい親水性官能基の種類や量、重合連鎖分布等も容易に設計でき、さらにコーティングプロセス自体も簡便で、生産性も高くなるので好ましい。

#### 【0044】

支持多孔膜の親水化処理にコーティング法を用いる場合、支持多孔膜の水保持性が向上するのであれば、そのコーティング用ポリマーの種類は限定されないが、例えば、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、2-ヒドロキシプロピルメタクリレートのようなアルコール性水酸基を有する（メタ）アクリル酸エステル系モノマー類、（メタ）アクリルアミド、N-1置換（メタ）アクリルアミド、N, N-2置換（メタ）アクリルアミド等の（メタ）アクリルアミド系モノマー類、 $-CH_2CH_2O-$ の繰り返し単位数が1～100のポリオキシエチレン基を有するアルコキシポリエチレングリコールの（メタ）アクリル酸エステル系モノマー類等の1種または2種以上から合成される親水性ポリマーが挙げられる。

#### 【0045】

ただし、コーティング用ポリマーの親水性が高すぎる場合には、細胞培養中にコーティング用ポリマーが培養液へ溶出し、培養細胞の増殖等に悪影響を及ぼす可能性も否定できないので、コーティング用ポリマーの溶出性を抑制するため等の目的に、その他の疎水性モノマー類を適量共重合させてコーティング用ポリマーを合成するのが好ましい。

また支持多孔膜の親水化処理は、製造プロセス上だけではなく、細胞培養用隔膜としての使用上においても必要な場合がある。例えば、支持多孔膜の親水化処理によって細胞接着性を抑制し、細胞増殖能を最大限に発現させるために材料表面の最適化を行う場合には、上記の親水性ポリマーや、ウレタン系ポリマー、コラーゲンといった従来公知の生体適合性ポリマーの1種もしくは2種以上をコーティングしても構わず、使用されるポリマー

は上記に限定されるものではない。

【0046】

上記のような親水化処理等の表面改質は、支持多孔膜に対して行うのと同様に、得られる細胞培養用隔膜に施してもよい。

細胞培養用隔膜の表面改質を行う方法も限定されないが、支持多孔膜の場合と同様にコーティング法が好ましい。細胞培養用隔膜の表面改質も、細胞接着性の抑制や、逆に細胞接着性の付与等を目的として行われる。コーティング法が用いられる場合には、コーティング用ポリマーとして既述の親水性ポリマー、コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン等、ゼラチン、レクチン、ポリリジン等の従来公知の生体適合性ポリマーの1種または2種以上を用いることができる。

【0047】

本発明の細胞培養用隔膜の製造方法によれば、多孔膜が支持多孔膜表面に形成される過程において、多孔膜が支持多孔膜の微細な表面凹凸（支持多孔膜が不織布やメッシュのような繊維状媒体の場合には繊維交絡部）に侵入するため、支持多孔膜と多孔膜との強固な接着状態を実現することが可能となる。これに対し、一旦ガラスのような固体基板上に多孔性薄膜を成膜して、それを剥がして、単に支持多孔膜に重ね合わせただけでは、両者は接着されていないので、例えば、引っ張ることによって両者にずれが生じて簡単に多孔性薄膜に破損が発生するので、取り扱いや加工が困難となり実用的ではない。

したがって、本発明で得られる細胞培養用隔膜は十分な強度を有するので、中空糸状（円筒状）、袋状、プリーツ状、その他の種々の形態に加工することも容易である。例えば、同じ大きさの四角形状に切断した2枚の細胞培養用隔膜を、内側を支持多孔膜（例えば、不織布）にして重ね合わせて3辺をヒートシールすれば、内側に不織布が存在し、その全周囲を多孔膜が覆った袋状の細胞培養用隔膜シートを得ることができる。

【0048】

本発明で用いられる測定法は、以下のとおりである。

(1) 多孔膜の平均孔直径 $D$ 、孔直径の標準偏差 $\sigma$ 、開孔率および貫通孔の割合

多孔膜の平均孔直径 $D$ 、孔直径の標準偏差 $\sigma$ 、および開孔率は、多孔膜の膜平面に対する垂直方向からの光学顕微鏡または走査型電子顕微鏡写真を撮影し、得られる平面像（写真）にて観測される多孔膜の孔群（貫通孔と非貫通孔をあわせたもの）を画像解析ソフト Image-Pro Plus (Media Cybernetics (株) 製、Version 4.0 for Windows (登録商標)) を用いてピックアップし、これを画像解析することによって測定する。

【0049】

具体的には、得られる細胞培養用隔膜の中心付近から直径40mmの円形サンプルを打ち抜き、その円形の中心（点A）、および点Aにて直交する2本の直線と円周とが交わる4つの交点をB'、C'、D'、E'とし、それら4つのと点Aとの4つの中点をそれぞれB、C、D、Eする。それらA～Eの5点について、走査型電子顕微鏡写真（日立製作所製S-3000N）を、多孔膜が接着した側の膜面の垂直方向から撮影する（1000～3000倍）。

こうして得られた5枚の写真を画像解析ソフトに取り込み、各写真において約200個の孔を含んだ画像範囲を無作為に選択して画像のコントラストを、画像解析できるように十分に調整し、暗部領域（孔領域）を自動抽出する。さらに抽出された各暗部領域の中から孔部分とは明らかに異なるものを手動削除し、選択した5つの画像範囲に含まれる孔の平均孔直径をそれぞれ計算する。次いで、5つの写真の値を平均化して「平均孔直径 $D$ 」を算出する。

【0050】

孔直径の標準偏差 $\sigma$ は、上記の「平均孔直径 $D$ 」を規定した5つの画像範囲におけるそれぞれの孔直径の標準偏差をさらに平均化した値である。「開孔率」は、同じ画像範囲において得られた5つの開孔率を平均化したものである。

なお、上記のような画像の自動解析が困難な場合は、手作業を含む種々の方法を組み合

わせて写真解析を行うこともできる。

貫通孔の割合は、上記のD、 $\sigma$ および開孔率を算出したそれぞれ5つの画像領域において、各写真に含まれる全孔数をN1、そのうち貫通している状態の孔数をN2とすると、両者を数えて $(N2/N1) \times 100$  (%)の値を計算し、それら5つの平均値として算出する。

#### 【0051】

##### (2) 細胞培養用隔膜の膜厚の測定

細胞培養用隔膜を、走査型電子顕微鏡用の円盤状試料台に両面テープ等を用いて緩やかに接着固定して白金蒸着する(蒸着膜厚は約12nmになるように設定)。これを走査型電子顕微鏡((株)日立製作所製S-3000N)で観察し、膜の真横方向(膜平面方向)から膜断面が写った写真を撮影し、この写真の膜断面から、写真に記載されたスケールをもとに、細胞培養用隔膜およびそれを構成する多孔膜の膜厚を測定する。

断面観察のためのサンプルは、一般的に走査型電子顕微鏡観察の前処理として行われるように、エタノールに浸漬した後、液体窒素中にて凍結し、それを切断して作成する。

#### 【0052】

##### (3) 支持多孔膜の平均気孔径の測定

平均気孔径は、Automated Perm Porometer (登録商標) (Porous Materials, Inc. 社製)を用い、ASTM-F316-86に記載されているバブルポイント法に準じて評価する。測定には、支持多孔膜の孔内部まで十分に濡れる液体を用いる。

#### 【0053】

##### (4) 接着性試験

細胞培養用隔膜を10mm×10mmの正方形に切り、試験片とする。これを50mlの水を入れた50mlビーカーに投入し、30分浸漬する。その後、長さ25mmの攪拌子(最太部直径8mm)を入れ、200rpmの速さで30分攪拌して、細胞培養用隔膜から多孔膜が剥離するか否かを観察し、剥離しなかった場合を○、剥離した場合を×として評価する。

#### 【0054】

##### (5) 簡易引っ張り試験

細胞培養用隔膜、または多孔性薄膜(これは比較例1にて作成される)を、15×25mmに切り試験片とする。各試験片の両端(短辺部)から5mmのところをそれぞれBINDER CLIPS (登録商標) (LION社製 No. 107)ではさみ、片方を固定して膜を垂直につるす。他方のクリップに30gまたは50gのおもりを付けて、細胞培養用隔膜または多孔性薄膜が切れるかどうか観察する。50gでも切れなかった場合を○(引っ張り強度は50g以上)、30gで切れた場合(引っ張り強度は30g未満)を×として評価する。

#### 【実施例】

#### 【0055】

以下に、本発明を実施例に基づいて具体的に説明する。但し、本発明はこれらによってなんら限定されるものではない。

#### 【0056】

##### 〔実施例1〕

##### (細胞培養用隔膜の製造)

##### 1-1. 支持多孔膜の準備

親水化剤として2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA、三菱レーヨン(株)製の重合体(PHEMA)の0.2wt%のエタノール溶液を調整し、これをポリエチレンフタレート(PET)製不織布にコーティングした。

具体的には、このPHEMA溶液にPET不織布を浸漬時間が約5秒になるように連続的に浸漬したのち、ニップロールにはさんで通過させて余分なコーティング溶液を除去し、乾燥してコーティング不織布反を得た。

PET不織布（旭化成（株）製；マイクロウエップ（登録商標））は、平均繊維径 $1.2\mu\text{m}$ 、平均気孔径が $6.3\mu\text{m}$ 、目付け量 $40\text{g}/\text{m}^2$ （不織布 $1\text{m}^2$ あたりの繊維重量）、厚み $0.2\text{mm}$ である。

HEMAは、HEMAを、エタノール中、アゾビスイソブチロニトリル（AIBN）を開始剤としてラジカル重合して得られたものである。重量平均分子量は $4.1 \times 10^5$ （GPC法、標準ポリスチレン換算）である。

【0057】

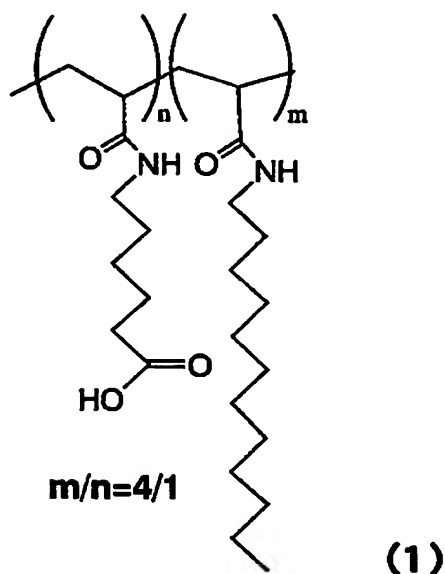
#### 1-2. 細胞培養用隔膜の成膜

クロロホルムを溶媒として、ポリ-ε-カプロラクトン（PCL）（和光純薬工業（株）製、平均分子量約70,000～100,000）とポリアクリルアミド系両親媒性ポリマー（化学式（1））を溶質とする $1\text{g}/\text{L}$ （0.067wt%）の疎水性有機溶媒溶液を調整した。PCL／ポリアクリルアミド系両親媒性ポリマーは重量比で9／1であった。

既述の化学式（1）のポリアクリルアミド系両親媒性ポリマーは、ユニットmとユニットnのモル比が $m/n=4/1$ のランダムコポリマーである。

【0058】

【化2】



【0059】

ポリアクリルアミド系両親媒性ポリマーは、ドデシルアクリロイルアミド（ $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}-\text{C}_{11}\text{H}_{22}-\text{CH}_3$ ）（Aモル）と6-アクリルアミドヘキサン酸（ $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}-\text{C}_5\text{H}_{10}-\text{COOH}$ ）（Bモル）を $A/B=4/1$ のモル比にてベンゼン中、AIBNを開始剤とするラジカル重合法により製造した（モノマー濃度6wt%、重合温度 $60^\circ\text{C}$ ）。得られた両親媒性ポリマーの重量平均分子量は $2.5 \times 10^4$ であった（GPC法、標準ポリスチレン換算）。

6-アクリルアミドヘキサン酸は、塩化アクリロイル（アルドリッチ（株）製）と6-アミノヘキサン酸（アルドリッチ（株）製）を水溶媒中、 $0^\circ\text{C}$ で脱塩化水素反応して合成した。ドデシルアクリロイルアミドは、塩化アクリロイルとドデシルアミン（アルドリッチ（株）製）をクロロホルム溶媒中、 $0^\circ\text{C}$ で脱塩化水素反応して合成した。

【0060】

次に、1-1で準備したコーティング不織布から一辺 $90\text{mm}$ の正方形に切り抜いたものを3枚準備し、3枚ともビーカー中にて純水に浸漬し、超音波洗浄器で5分間脱気しながら十分に水を保持させた。

この水を充分保持した不織布（含水不織布）の1枚をビーカーから取り出してガラス板

上におき、さらに一辺80mmの正方形を打ち抜いた厚さ1mmの金属枠を、金属枠の打ち抜き部全面から含水不織布が露出するように不織布上に重ねて配置し、ガラス板、含水不織布、金属枠を重ねた状態でクリップを用いて固定した。含水不織布が露出した金属枠の打ち抜き部に、準備しておいたPCLとポリアクリルアミド系両親媒性ポリマーを含むクロロホルム溶液を、静かに4ミリリットル流し入れ、室温25℃、相対湿度40%の恒温恒湿室中にて、溶液表面に相対湿度60%のエアーを6リットル/分で吹き付けクロロホルム除去を行って含水不織布上にPCLを主成分とする多孔膜を形成させた。

#### 【0061】

金属枠をはずし、室温で不織布を風乾した。上記の操作をさらに残り2枚の含水不織布に対しても繰り返すことにより、PCL系多孔膜と不織布が複合化されたものを作成し、それぞれのPCLが複合化された領域(約80×80mm)から縁の部分を10mmずつ切り落として、60×60mmの細胞培養用隔膜を3枚得た。

得られた3枚の細胞培養用隔膜の1枚を物性測定用とした。その細胞培養用隔膜の膜厚は約240 $\mu$ m、多孔膜の膜厚は約4 $\mu$ m、Dは4.9 $\mu$ m、 $\sigma/D$ は0.31、開孔率は30%、および貫通孔の割合は87%であった。

得られた細胞培養用隔膜の表面を、多孔膜側から撮影した走査型電子顕微鏡写真を図1(1000倍)および図2(3000倍)に示す。これらの図から、多孔膜の孔を通して支持多孔膜である不織布の構造を観察することができる。接着性試験を行った結果、多孔膜は支持多孔膜から分離することはなかった。簡易引っ張り試験では、50gでも試験片が切れることは無く、多孔膜に亀裂等も見当たらなかった。

#### 【0062】

(細胞培養用隔膜の加工による袋状細胞培養用隔膜シートの製造)

作成した2枚の細胞培養用隔膜(60×60mm)を、それぞれ0.3%のI型コラーゲン水溶液((株)高研製CELLGENI-PC)に浸漬したのち風乾して、コラーゲンコートした細胞培養用隔膜を得た。その2枚を、不織布側面を内側にして4辺を重ね合わせ、4辺のうち3辺を約5mm幅にてヒートシールし、袋状の細胞培養用隔膜シートを製造した。

#### 【0063】

(細胞の共培養)

92mm $\phi$ のポリスチレン製滅菌シャーレ(バルマーク社製)に細胞培養液(GIBC O社製、D-MEM)を20mL加え、これに、作成した袋状細胞培養用隔膜シート(60×60mm)の1枚を一旦完全に浸漬した後、袋の開口部を液面より上げ、ここからモデル細胞としてヒト腎細胞(ATCC番号:CRL-1573)の $2.5 \times 10^4$ 個を加えた。続いて、その開口部をクリップにて完全に封鎖して再度細胞培養液に装入した後、モデル細胞としてヒト子宮頸部腺癌細胞(ATCC番号:CCL-2)の $2.5 \times 10^5$ 個を、袋状細胞培養用隔膜シートの外側の培養液に、その袋状隔膜の上面に播くように加えた。

#### 【0064】

上記のシャーレを5%CO<sub>2</sub>、95%空気の雰囲気下、37℃の保湿インキュベータ内で3日間共培養した(培養液は全量の1/2を毎日交換した)。3日後、まず袋状隔膜シート内の細胞を、培養液に浸漬した状態でのピペッティングとサンプリングを繰り返して回収した。続いて、シートの外側の細胞を、0.25%のトリプシン溶液処理を施した後、ピペッティングとサンプリングにて回収した。

回収した培養液中の細胞数を血球計算盤(サンリード硝子有限会社製EOSINOPHIL COUNTER)を用い、位相差光学顕微鏡下でカウントした結果、隔膜シートの内部および外部の細胞数は、いずれも3倍以上に増加していることが分かった。

#### 【0065】

〔比較例1〕

実施例1にて使用したガラス板と金属枠を重ね合わせて固定し、金属枠の打ち抜き部分(80×80mm)のガラス面上に実施例1で作成したPCL/ポリアクリルアミド系両親

親媒性ポリマーのクロロホルム溶液 4 ml を注ぎ、室温 25℃、相対湿度 40% の恒温恒湿室中にて、溶液表面に相対湿度 60% のエア－を 6 リットル／分で吹き付けてクロロホルム除去を行って PCL を主成分とする多孔性薄膜を形成させた。ガラス板上の多孔性薄膜はエタノールで湿らせてゆっくりと剥離し、正方形の支持枠に付着固定して取り出した。

得られた多孔性薄膜の一部を電子顕微鏡で観察すると、図 1 の写真よりも孔径均一性の高い類似の孔サイズの規則的な孔構造が観察された。しかし、この薄膜は膜強度が極めて低く、簡易引っ張り試験を行った結果、30 g では試験片が切れ実用的な強度がないことが分かり、袋状といった実用的な形態への加工等も全く困難であった。

【産業上の利用可能性】

【0066】

本発明の細胞培養用隔膜は、目的とする有用な細胞の増殖が異種細胞との細胞間接触によって促進される場合であって、しかも増殖後にはその有用細胞のみを選択的に回収したい場合の細胞培養用隔膜として有効に使用される。特にこの細胞培養用隔膜を用いて、造血幹細胞を未分化のまま大量に増殖できる可能性があるため、再生医療分野や輸血分野（培養血液細胞を用いるクリーンな輸血）において非常に効果的に利用されることが期待される。

また、この細胞培養用隔膜を、単独細胞種の培養によって細胞が産生する有用高分子成分（例えば、タンパク製剤等）を回収・利用するバイオプロセス分野においても隔膜として使用すれば、細胞産生物質が隔膜で隔てられた細胞の存在しない領域に極めて効果的に出て行くため、細胞と分離された、有用高分子成分を含有する培養液を連続的に得る培養システムを構築することも可能である。

【図面の簡単な説明】

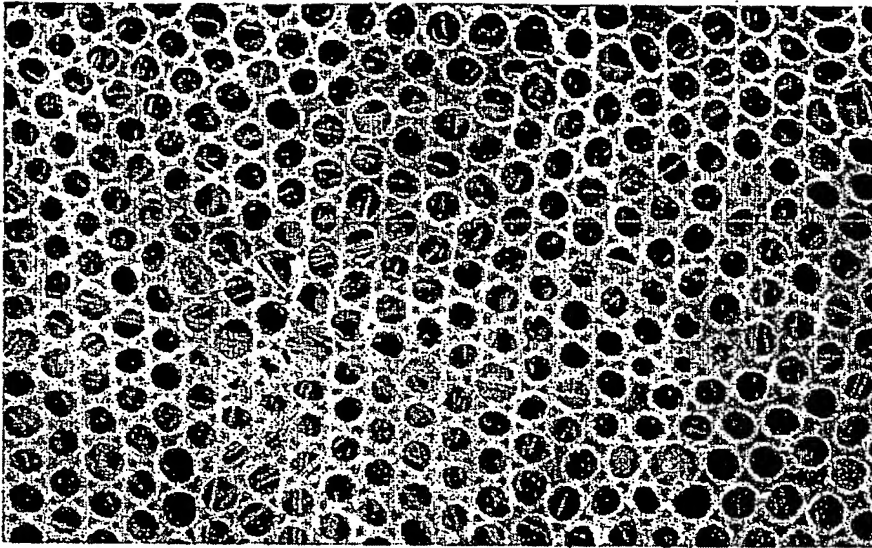
【0067】

【図 1】 実施例 1 で得られた細胞培養用隔膜の、多孔膜側表面の走査型電子顕微鏡写真（1000 倍）である。

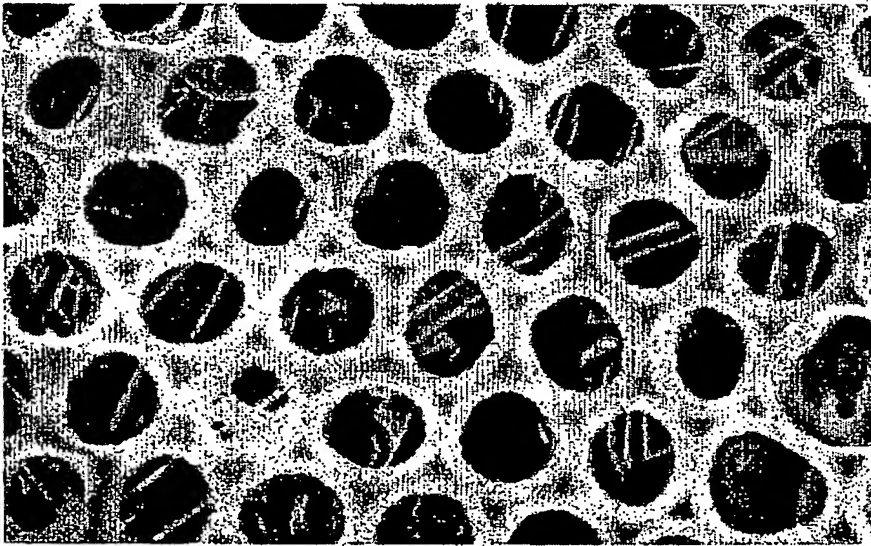
【図 2】 実施例 1 で得られた細胞培養用隔膜の、多孔膜側表面の走査型電子顕微鏡写真（3000 倍）である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 細胞培養液中にて、2種以上の異種細胞群を共培養する際、異種細胞群が互いに混じり合うことなく分離された状態を維持し、しかも分離された異種細胞同士の間細胞間接触を効果的に可能とする細胞培養用隔膜であって、効果的な培養に適する膜形態、または増殖後の目的細胞の分離を容易とする種々の膜形態への加工が可能な膜強度を有する細胞培養用隔膜を提供すること。

**【解決手段】** 有機高分子化合物からなる多孔膜と、これに隣接する支持多孔膜により構成され、多孔膜に隣接する支持多孔膜面の少なくとも一部において、多孔膜を構成する有機高分子化合物が支持多孔膜中に侵入しており、多孔膜は特定の開孔率、平均孔直径、孔直径の標準偏差をもち、多孔膜が有する貫通孔の割合が30%以上である細胞培養用隔膜。

**【選択図】** 図2。

特願 2 0 0 3 - 3 5 8 9 8 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 0 0 3 3 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 1 月 4 日

[変更理由]

名称変更

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜 1 丁目 2 番 6 号

氏 名

旭化成株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**